

**Die Wirkung des Heparins
als Antithrombin
seine Aktivierung und Hemmung
in Plasma und Serum**

Roman Dykyj

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

DIE WIRKUNG DES HEPARINS ALS ANTITHROMBIN

SEINE AKTIVIERUNG UND HEMMUNG IN PLASMA UND SERUM

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Roman Dykyj

geb. Chorosno-Lemberg (Ukraine)

wohn. in Philadelphia/USA

München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 4. November 1958





Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Die Wirkung des Heparins auf das gereinigte System	7
	1. Die Wirkung auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion	7
	2. Die Wirkung auf die Thrombinadsorption	9
II.	Die Antithrombinwirkung des Heparins im Plasma	11
	1. Antithrombin III	12
	2. Antithrombin II	14
III.	Die Antithrombinwirkung des Heparins im Serum	18
	Der Heparininhibitor	18
IV.	Diskussion	20
V.	Experimenteller Teil	23
	1. Methodik	23
	2. Die Wirkung verschiedener Heparinkonzentrationen auf eine geometrische Serumverdünnung	24
	3. Die Wirkung des Heparins auf hitzeinaktiviertes Serum	25
	4. Die Wirkung der Thrombocyten auf die Heparin- aktivität	27
	5. Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität des Co-Faktors und Inhibitors	30
	6. Aktivitätskurven des Heparin-Co-Faktors und des Heparin-Inhibitors	31
VI.	Zusammenfassung	35
VII.	Literaturverzeichnis	36

DIE WIRKUNG DES HEPARINS ALS ANTITHROMBIN

Seine Aktivierung und Hemmung in Plasma und Serum.

Schon bald nach der Entdeckung des Heparins durch Mc LEAN (1) 1916 konnte von HOWELL-HOLT (2) der Antithrombincharakter des Heparins nachgewiesen werden. Dabei fanden diese Untersucher, dass Heparin in plasmafreien Systemen keine Antithrombinwirkung entfaltet. Dieser Befund konnte später von QUICK (3) u. a. (4 - 10) bestätigt werden. Es wurde ein plasmatischer Aktivator angenommen, welcher von HOWELL-HOLT (2) als Co-Faktor, von CHARGAFF (8) als Heparinkomplement, von ASTRUP-DARLING (9) als Co-Inhibitor bezeichnet wurde.

I. DIE WIRKUNG DES HEPARINS AUF DAS GEREINIGTE SYSTEM.

1. Die Wirkung auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion.

MELLANBY (11) stand damals allein mit der Ansicht, dass Heparin in Gegenwart von Neutralsalzen direkt als Antithrombin reagiert. Später konnten dann SHINOWARA (12), GORTER-NANNINGA (69) sowie GOOSENS-GASTPAR-SEITZ (13) im Gegensatz zu obengenannten Autoren (2 - 10) feststellen, dass Heparin auch in gereinigtem Thrombin-Fibrinogen-System zu einer signifikanten Gerinnungsverzögerung führt. Dies konnte kürzlich von GASTPAR u. Ma. (14) bestätigt werden. Auf Grund des Reinheitsgrades der verwendeten Reagenzien und stöchiometrischen Berechnungen konnten Heparinaktivierungen durch Verunreinigungen der Substanzen ausgeschlossen werden.

AMANN-WERLE (15) bestätigen die Ergebnisse von GOOSSENS-GASTPARSEITZ (13). Sie kommen auf Grund ihrer Untersuchungen zu dem Schluss, dass Heparin im System Thrombin-Fibrinogen auf Grund seiner starken negativen Ladung als kompetitiver Hemmkörper des Thrombins auftritt, indem es einen Teil desselben abfängt. Auch FISCHER (16) erklärte die Wirkung des Heparins durch Blockierung der Bindung der reagierenden Eiweiskomponenten. SNELLMAN u. Ma. (17) sowie LYTTLETON (18, 19) konnten feststellen, dass die elektropheretische Wanderung von Thrombin in Gegenwart von Heparin verändert wird, weswegen sie eine Heparin-Thrombin-Komplexverbindung annehmen, wodurch es zu einer Verminderung der Thrombinaktivität kommen soll.

GREEN (20) nimmt demgegenüber an, dass Heparin nicht direkt am Thrombin angreift, sondern auf eine intermolekulare Reaktion bei der Fibrinpolymerisation einwirkt, welche zur Bildung von Disulfidbrücken führt. Auch SHEPPARD (21) konnte einen hemmenden Effekt des Heparins auf die Fibrinpolymerisation nachweisen, welche er auf der Basis einer elektrostatischen Wechselwirkung erklärt. Er fand nämlich, dass Heparin das Zeta-Potential von Fibrinogenlösungen mit niedriger Ionenstärke erhöht (48).

Als proteolytisches Ferment greift Thrombin aktiv in die Fibrinogenumwandlung ein und spaltet nach LORAND (22) ein glutaminsäurehaltiges Peptid (36) vom Fibrinogen ab, welches als Fibrinopeptid bezeichnet wird. Dadurch wird die elektrische Ladung des Fibrinogenmoleküls verändert und die Möglichkeit zur Polymerisation gegeben. In Abhängigkeit vom pH der Lösung legen sich die Fibrinogenmoleküle mit ihren Mittel- und Endstücken Seit-zu-Seit oder End-zu-End aneinander (23, 24). Die Fixation der Moleküle erfolgt dabei teils durch Ausbildung echter chemischer Bindungen (Disulfidbrücken, Carboxyl-Aminogruppenbildungen, Peptidbindungen), teils durch elektrostatische Kräfte.

Nach FERRY (25) ist die Fibrinbildung ein dreistufiger Vorgang:

$$\text{Fibrinogen} \longrightarrow f \xrightleftharpoons{n} f_n \longrightarrow \text{Fibrin}.$$
 Dabei bedeutet f das noch nicht polymerisierte Fibrin, f_n von FERRY (25) auch aktiviertes Fibrinogen genannt, f_n das noch in Lösung befindliche Polymerisationsprodukt, während f_n Fibrin das dreidimensionale Struktur aufweisende Endprodukt bedeutet. Bei Ende der Gerinnung, mit Auftreten des Gerinnsels, sind die

beiden ersten Stufen der Reaktion vollkommen abgelaufen, die dritte Stufe dagegen nur zu einem kleinen Teil. Der grösste Teil der dreidimensionalen Aggregation erfolgt erst später. Die physikalischen Eigenschaften des Gerinnsels wie Trübung, Elastizität, Festigkeit, Adhäsions- und Reaktionsfähigkeit sind nach MORRISON (26) weitgehend von der Konzentration des Fibrinogens und Thrombins, der Wasserstoffionenkonzentration und Ionenstärke, sowie der Temperatur und der Schnelligkeit der Gerinnung abhängig.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Beobachtungen von GAST-PAR (27) welcher fand, dass es bei Zusatz grösserer Heparinkonzentrationen (2 - 3 IE/ml) zu gereinigtem Thrombin-Fibrinogen-System in Veronalpuffer $\text{ph} = 7,1$ zu keiner en bloc-Gerinnung kommt. Vielmehr treten nach einer bestimmten Zeit, in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration, feinere oder gröbere Fibrinflöckchen auf. Ohne Heparin oder bei geringen Heparinkonzentrationen kommt es dagegen, bei sonst gleichen Bedingungen, zur Ausbildung eines kompakten Gerinnsels. Vermutlich bewirkt Heparin eine Blockierung im Ablauf des Polymerisationsvorganges und es kommt zu einer Hemmung der dreidimensionalen Netzwerkstruktur. An welcher Stelle der Fibrinogenumwandlung Heparin angreift, ob es die Thrombinwirkung durch intermolekulare Blockierung der Fibrinpolymerisation hemmt (20, 21) oder ob es durch Bildung einer Heparin-Thrombin-Komplexverbindung zu einer elektrischen Potentialverschiebung (17 - 19) und damit zu einer Fermenthemmung kommt (28), ist noch nicht geklärt.

2. Die Wirkung auf die Thrombinadsorption.

Neben dieser Wirkung dürfte Heparin jedoch noch auf eine andere Weise in die Reaktion zwischen Thrombin und Fibrinogen eingreifen. KLEIN-SEEGERS (29) konnten feststellen, dass die Fähigkeit des Fibrinogens Thrombin adsorbieren (30, 31) durch Heparin bedeutend verstärkt wird. Dies konnte durch SOKAL (32) bestätigt werden, während MARBET-WINTERSTEIN (33) dieser Thrombinadsorptionssteigerung durch Heparin quantitativ keine grössere Bedeutung beimessen. Fibrinogen in seiner

Eigenschaft als Thrombinadsorbens wurde daher von SEEGER (34) als Antithrombin I bezeichnet. Zweifellos wird das Thrombin jedoch nicht an das Fibrinogen adsorbiert, sondern es lagert sich an dasselbe nur an. Die eigentliche Adsorption dürfte erst durch das entstandene Fibrin in statu nascendi erfolgen. Es handelt sich dabei um eine echte Adsorption. Das Thrombin wird in seiner Wirkung zwar neutralisiert jedoch nicht zerstört, denn die Thrombinaktivität kann durch die Fibrinolyse wieder gewonnen werden (29).

Da der Adsorptionsprozess durch Heparin gesteigert werden kann, schreiben KLEIN-SEEGERS (29) dem Fibrinogen Co-Faktoreigenschaften zu. Ohne Zweifel spielen bei der komplexen Wirkung des Heparins als Thrombininhibitor elektrostatische Momente eine entscheidende Rolle, wenn man bedenkt, dass Heparin mit einem Schwefelsäureestergehalt von 45 % das Molekül mit den stärksten ionisierbaren Verbindungen unseres Körpers darstellt (35). Das viel schwächer saure Albumin setzt im Gegensatz zu Heparin die Thrombinadsorption herab (29). Da der isoelektrische Punkt von Albumin ($pH = 4,9$) und Thrombin ($pH = 4,8$) fast zusammenfällt, tritt Albumin wahrscheinlich mit dem Thrombin in Konkurrenz und bindet die freien Valenzen des Fibrinogens ab (27). Eigentümlicherweise ist die adsorbierte Thrombinmenge für eine bestimmte Fibrinogenkonzentration umso grösser, je höher die Thrombinkonzentration ist. Dies gilt relativ auch bei Zusatz von Albumin bzw. Heparin. Während eine 1%ige Fibrinogenlösung bei einer Thrombinkonzentration von 50 NiHE/ml 44 absorbiert, beträgt die Adsorption bei einer Konzentration von 3000 E 1860 E Thrombin. Bei Zusatz von 3%igen Albumin beträgt die entsprechende Adsorptionsmenge 42 bzw. 1460 E Thrombin, bei Zusatz von 1 IE Heparin dagegen 44 bzw. 2080 Einheiten (29). Wie man ersieht kommt der Unterschied erst bei den hohen Thrombinkonzentrationen zu voller Geltung.

GASTPAR (27) sucht eine Erklärung für die Heparinwirkung in gereinigtem System darin zu finden, dass Heparin infolge seiner im Vergleich zu Fibrinogen viel stärkeren negativen Ladung einen Teil der positiv geladenen, basischen Gruppen des Thrombins abfängt (15). Dieser Heparin-Thrombin-Komplex hat jedoch eine viel stärkere elektronegative Ladung als das freie Thrombin, wodurch die Anlagerung an das Substrat Fibrino-

gen (IP = pH 5,4) erschwert und die Gerinnung verzögert wird. GASTPAR (27) nimmt ferner an, dass durch die Anlagerung der nicht abgesättigten positiven Ladungen des Thrombins an die negativen Carboxylgruppen des Fibrinogens die mit Heparin einen Komplex eingegangenen Thrombinmoleküle mit an das Fibrinogen adsorbiert werden, wodurch zahlenmässig eine grössere Thrombinmenge gebunden würde als ohne Heparinzusatz. Es läge dann gewissermassen ein Heparin-Thrombin-Fibrinogenkomplex vor, welcher durch den Polymerisationsprozess an das Fibringitterwerk fixiert würde. Damit könnten auch die Befunde von GREEN (20) und SHEPPARD (21) über eine Polymerisationshemmung durch Heparin eine Erklärung finden.

II. DIE ANTITHROMBINWIRKUNG DES HEPARINS IM PLASMA,

Die direkte Heparinwirkung auf das gereinigte System fällt nach LYTTLETON (19) erst bei einer Konzentration über 2 IE/ml ins Gewicht. Im Gegensatz dazu konnten GASTPAR u. Ma. (14) kürzlich auch bei einer Heparinkonzentration von 0,1 IE/ml signifikante Thrombinzeitverlängerungen messen. Wird jedoch zu dem System Thrombin-Fibrinogen eine kleine Menge Plasma zugesetzt, so wird die Heparinwirkung um ein vielfaches verstärkt (13). Es handelt sich dabei um eine sofort einsetzende Gerinnungshemmung, welche von der langsamer ablaufenden, progressiven Thrombininaktivierung durch das Plasmaantithrombin (Antithrombin III nach SEEGER 34) unterschieden werden muss. Es wurde daher im Plasma, wie schon erwähnt (2 - 10) ein heparininaktivierendes Protein vermutet. Dieser Heparin Co-Faktor wurde später von SEEGER (34) als Antithrombin II bezeichnet. Wegen seiner sofortigen Wirkung nennen die Franzosen den Heparin-Co-Faktor-Komplex auch vielfach Antithrombine immédiate.

1. Antithrombin III

Das Antithrombin III (auch Plasma-Antithrombin oder Antithrombin^e progressive) beinhaltet ca. 80 % der Gesamt-Antithrombinaktivität (40). Es inaktiviert Thrombin zum Metathrombin. Dieser Prozess ist nicht reversibel und ist verbunden mit einem echten Thrombinverbrauch. Es handelt sich dabei um eine fermentative Reaktion, welche nach ASTRUP-DARLING (9) und Untersuchungen von SEEGERs und Ma. (34, 41) durch Heparin nicht beeinflusst wird, während QUICK (42), in älteren Arbeiten auch SEEGERs und Ma. (43, 44), sowie neuerdings BURSTEIN (45) und LOEB (46) eine katalytische Wirkung des Heparins auf Antithrombin III annehmen, wodurch die Affinität des Antithrombins zum Thrombin verstärkt werden soll. MIHÁLYI (63), SOKAL (32), BURSTEIN-GUINAND (47) sowie WAUGH-FITZGERALD (56) sahen eine zweite Wirkung des Heparins auf Antithrombin III in einer Steigerung des Antithrombinverbrauches.

Durch Behandlung mit Aether oder Chloroform wird die Aktivität des Antithrombin III zerstört (45, 49, 53), Antithrombin III ist bei pH 6,0 - 8,5 stabil (18). Die optimale Temperatur für seine Wirkung liegt zwischen 35 und 40° (50, 54, 41), das optimale pH bei 7,3 (54). Antithrombin III wird nach ASTRUP (55) bei 65 %iger Sättigung mit Ammoniumsulfat gefällt, nach LYTTLETON (18) bei einem pH = 7,0 und 70 % Sättigung. FELL und Ma. (53) fanden dagegen Antithrombin III nur bei einem Sättigungsgrad bis zu 50 %, während bei einer Sättigung 50 - 70 % der grösste Teil des Antithrombin II ausfallen soll. Antithrombin III wird durch Tricalciumphosphat und Aluminiumhydroxyd adsorbiert (53, 74) nicht dagegen an Kaolin, Tierkohle, Asbest, Bariumsulfat und Magnesiumhydroxyd (58). OWEN-MACKENZIE (59) fanden bei Auftrennung von Humanplasma in der Elektrophorese Antithrombin III in der α_2 -Globulinfraktion. Nach LYTTLETON (18, 19) wandert sowohl Antithrombin III als auch Antithrombin II bei der Elektrophorese in der α -Globulinfraktion. Letzteres soll sich von Antithrombin III durch seine geringe Stabilität gegenüber Temperatur und pH-Einflüssen unterscheiden. Die Inaktivierungstemperatur

für Antithrombin III wird allgemein mit 65° angegeben (60, 49, 42, 40).

Plasma bzw. Serum enthält eine so grosse Menge Antithrombin III, dass ein Vielfaches der zur Gerinnung erforderlichen Thrombinmenge inaktiviert werden kann. Der grösste Teil des zugesetzten Thrombins wird innerhalb von 15 bis 30 Minuten inaktiviert, der Rest jedoch sehr langsam. Die von einer bestimmten Menge Plasma innerhalb von 2 Stunden inaktivierte Thrombinmenge ist von der zugesetzten Thrombinkonzentration abhängig. 1 ml Plasma inaktiviert von 200 E Thrombin 195 E, von 500 E Thrombin 400 E. Die maximale Thrombinmenge, welche von 1 ml Plasma inaktiviert werden kann, beträgt 400 - 500 E (41), vielleicht sogar noch mehr (62). Im Serum ist die Thrombinaktivität bedeutend geringer als im Plasma (41, 58, 63, 64). Die Differenz zwischen Plasma und Serum nimmt mit der zugesetzten Thrombinmenge zu (41).

Da auch die Inaktivierung kleiner Thrombinmengen durch Antithrombin III eine ziemlich lange Zeit erfordert (mindestens 10 Minuten), ist gleichzeitig vorhandenes Fibrinogen in der Zwischenzeit längst geronnen. Nach QUICK (42), ist nämlich die Affinität des Thrombins zu Fibrinogen weit aus grösser als zu Antithrombin III. Dementsprechend wird, solange Fibrinogen vorhanden ist nur wenig Thrombin inaktiviert. Es ist daher nur schwer vorstellbar, dass Antithrombin III zur Verhütung intravasaler Gerinnungsvorgänge von Bedeutung sein soll. QUICK und Ma. (61) sind der Meinung, dass das Fibrin in seiner Rolle als Thrombinadsorbens als eigentliches Antithrombin fungiert, indem es den Grossteil der Thrombinaktivität abbundet und nur kleinste Thrombinmengen an das Plasma abgibt, welche dann wieder mit Fibrinogen reagieren können. SEEGER (62) glaubt jedoch nicht an einen solchen Mechanismus, da er keine grösseren Thrombinmengen durch Fibrinolyse des Gerinnsels wieder erhalten konnte. Es wäre daher am ehesten anzunehmen, dass das adsorbierte und damit im Moment nicht mit Fibrinogen reaktionsfähige Thrombin durch Antithrombin III inaktiviert wird (27). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen GERENDÁS und Ma. (50, 67, 68). Sie unterscheiden zwei Phasen der Thrombininaktivierung. Die erste setzt sofort ein, sobald man Thrombin und Serum zusammenbringt und besteht in einer Thrombinadsorption. Sie beträgt etwa 70 % der Inaktivierung. Dieser schliesst sich

eine langsamer ablaufende Phase an, welche durch eine monomolekulare, fermentative Reaktion bedingt ist. Es spricht jedoch auch viel dafür, dass Antithrombin III sofort mit dem aus Prothrombin entstandenen Thrombin in statu nascendi reagiert (62), wodurch die Differenz zwischen der Antithrombin III-Aktivität des Plasmas und des Serums ihre Erklärung fände (41, 63, 64). Auch APITZ (65) vertrat schon diesen Standpunkt.

Nach LYTTLETON (18) besteht zwischen der Konzentration des Antithrombins und der inaktivierten Thrombinmenge keine lineare Beziehung. Es dürfte sich dabei weder um eine Reaktion erster noch zweiter Ordnung handeln. Hierauf werden die Schwierigkeiten bei den bisher gängigen Antithrombinbestimmungsmethoden zurückgeführt. Hingegen fand er eine lineare Beziehung zwischen der Antithrombinkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit. Man erhält eine Gerade, wenn man die prozentuale Menge Thrombin welche innerhalb von 10 Minuten inaktiviert wird gegen Antithrombineinheiten aufträgt.

2. Antithrombin II

Nach VOLKERT (40) beinhaltet Antithrombin II ca. 20 % der Gesamtantithrombinaktivität des Plasmas. Der Heparin Co-Faktor-Komplex wirkt nach KLEIN-SEEGER (29) störend (negativ fibrinoplastisch) auf die Thrombin-Fibrinogen-Reaktion ein, ohne dass dabei Thrombin zerstört wird (34). Nach ASTRUP-DARLING (38) und USTERI (39) stellen sowohl Heparin + Co-Faktor als auch der Heparin-Co-Faktor-Komplex + Thrombin stark dissoziierte Verbindungen dar. Es handelt sich somit um Gleichgewichtsreaktionen. Die Antithrombin III-Aktivität kann durch Aetherextraktion zerstört werden (45, 49-53), während Antithrombin II nicht angegriffen werden soll (53). Ausserdem wird zur Fällung des Antithrombin II durch Ammoniumsulfat ein höherer Sättigungsgrad benötigt als für die Fällung der Antithrombin III-Aktivität (53).

Über die Natur des Co-Faktors (Antithrombin II) herrscht noch immer keine Klarheit. Er wurde in älteren Arbeiten in der Albuminfraktion ver-

mutet (6, 7, 9, 10, 66), in neueren Untersuchungen wird er jedoch den Globulinen zugerechnet (18, 19, 39, 70, 71). Es scheint sich dabei um ein α -Globulin (18, 19) bzw. um ein α -Lipoprotein (46, 72, 73) zu handeln, welches von einem Teil der Autoren aus der Fraktion IV/1 nach COHN (39, 46, 71) von LOOMIS (70) und LYTTLETON (18) dagegen aus der Fraktion III/3 und von FITZGERALD-WAUGH (75) aus der Fraktion I isoliert werden konnte. Nach BURSTEIN-LOEB (71) beinhaltet jedoch allein die Fraktion IV/1 eine Co-Faktoraktivität. Sie konnten den Co-Faktor aus Fraktion IV/1 durch Adsorption an Aluminiumgel isolieren. Bei Rinderplasma als Ausgangsmaterial wurde eine 100 mal aktivere Substanz als im entsprechenden Ausgangsplasma gefunden. Die Fraktion IV/1 weist nach COHN (76) einen hohen Gehalt an Lipoproteinen auf. Nach LOEB (46) besitzt Fraktion IV/1 nach Denaturierung mit Fettlösungsmitteln (Aether, Chloroform, Amylalkohol) keine Co-Faktor-Eigenschaften mehr, weswegen er annimmt, dass der Co-Faktor ein Lipoprotein darstellt, welches durch Aether und Chloroform zerstört wird. CHARGAFF (8) und SNELLMAN und Ma. (17) konnten aus den Mastzellen einen Heparin-lipoprotein-Komplex isolieren. Dieser Komplex hatte Antithrombineigenschaften. Nach elektrophoretischer Trennung in Heparin und Lipoproteinanteil wies weder die eine noch die andere Komponente Antithrombinaktivität auf. Ob es sich bei der Lipoproteinkomponente um den Co-Faktor handelt, ist bisher nicht untersucht worden.

BURSTEIN und Ma. (45, 46, 71) konnten zeigen, dass sowohl der Co-Faktor als auch Antithrombin III dieselben physiko-chemischen Eigenschaften aufweisen: beide werden an Aluminiumhydroxyd und Tricalciumphosphat absorbiert (74), beide werden durch Fettlösungsmittel wie Aether, Chloroform und Amylalkohol zerstört, beide weisen dieselbe Thermolabilität auf und werden im Humanplasma bei 30 Min./58°, im Rinderplasma bei 30 Min./62° zerstört. Letztlich konnten beide in der Plasmafraktion IV/1 nachgewiesen werden. BURSTEIN und Ma. (45, 46, 71) glauben daher an eine Identität des Co-Faktors mit dem Antithrombin III und erklären die Antithrombinwirkung des Heparins mit einer Affinitätssteigerung des Antithrombin III zum Thrombin. Ähnliche Ansichten wurden früher schon von QUICK (42) und SEEGERs und Ma. (43, 44) geäußert. Ausserdem erscheint Heparin den Antithrombinverbrauch zu steigern (32, 47, 56, 63).

Mehrere von BURSTEIN und Ma. (45, 46, 71) berichtete Fakten stehen jedoch im Widerspruch zu den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren. So wird nach FELL und Ma. (33) der Co-Faktor im Gegensatz zu Antithrombin III durch Aether nicht angegriffen. Nach LYTTLETON (19) zeigt der Co-Faktor gegenüber Temperatur- und pH-Einflüssen eine geringere Stabilität als Antithrombin III, welches nach übereinstimmenden Untersuchungen erst bei 65° zerstört werden soll (40, 42, 49, 60), endlich wird nach ASTRUP-DARLING (9) sowie SEEGERs und Ma. (34, 41) Antithrombin III durch Heparin nicht beeinflusst. Bei Fällung durch Ammoniumsulfat soll die Co-Faktor- und Antithrombin-III-Aktivität bei verschiedenen Sättigungsgraden ausfallen (53).

Nach dem Stand der neuesten Untersuchungen (19, 56, 74) scheint es jedoch in Übereinstimmung mit BURSTEIN und Ma. (45, 46, 71), dass der Co-Faktor und das Antithrombin III trotzdem identisch sind. MONK-HOUSE und Ma. (74) konnten aus Rinderplasma durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd und nachfolgende Fällung mit Ammoniumsulfat eine Fraktion gewinnen, welche sowohl die Co-Faktor- als auch die Antithrombin III-Aktivität in achtfacher Konzentration gegenüber dem Ausgangsplasma enthält. Die beiden Aktivitäten konnten nicht voneinander getrennt werden. Es scheint also als ob die verschiedenen Wirkungen ein und derselben Substanz zukommen: einmal das Eingreifen in die Thrombin-Fibrinogenreaktion im Sinne einer Reaktionsverzögerung (Co-Faktorwirkung) und zum anderen die Thrombinaktivierung (Antithrombin III). Nach WAUGH-FITZGERALD (56) kann die Antithrombinwirkung des Heparins auf Plasma durch zwei Effekte quantitativ ausgedrückt werden: einmal in einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit der Thrombinaktivierung durch Antithrombin III um das annähernd 20fache. Zum anderen in einer Steigerung des Antithrombin III-Verbrauches um das annähernd Doppelte. Nach LYTTLETON (19) soll Antithrombin III aus zwei Komponenten bestehen, nämlich dem Co-Faktor und dem eigentlichen Thrombininaktivator.

Nach LYTTLETON (19) ist ferner die Co-Faktorwirkung abhängig von der Heparinkonzentration. Bei niedrigen Heparinkonzentrationen unter 1,0 IE/ml überwiegt eine sofortige Inaktivierung. Sie nimmt bei steigender Salzkonzentration ab und ist durch Verdünnung reversibel. Dies

spricht für eine elektrostatische Anziehung zwischen Heparin und Thrombin. Bei grösseren Heparinkonzentrationen kommt es dagegen zu einer überwiegend progredienten Inaktivierung. Sie ist durch Verdünnung nicht reversibel und besteht wahrscheinlich in einer Verbindung zwischen Co-Faktor und Thrombin. FITZGERALD-WAUGH (75) konnten dagegen zeigen, dass für diesen Effekt die Co-Faktorkonzentration entscheidend ist. Bei niedrigen Co-Faktorkonzentrationen ist der Heparin-Co-Faktor-Thrombinkomplex reversibel, bei hohen Co-Faktorkonzentrationen dagegen nicht.

Wie man sieht ist hier also noch vieles unklar. Ob Antithrombin II und Antithrombin III identisch sind oder zwei verschiedene Plasmaproteine darstellen, oder ob gar ein Plasmaprotein zwei voneinander unabhängige Wirkungen beinhaltet, kann nach dem bisherigen Stand der Forschung und den Divergenzen in den einzelnen Untersuchungsergebnissen - besonders im Bezug auf die physiko-chemischen Eigenschaften des Co-Faktors - nicht entschieden werden. Es handelt sich hier jedoch um eine mehr oder weniger theoretische Streitfrage, die für unsere eigenen Untersuchungen nur sekundäre Bedeutung hat. Nur der genaue Grad der Hitzestabilität des Co-Faktors spielt bei unseren Versuchen eine ausschlaggebende Rolle. ASTRUP-DARLING (9) sowie USTERI (39) gaben an, dass der Co-Faktor bei 5 Min./56° zerstört wird. Nach BURSTEIN (45) dagegen wird er im Humanplasma erst bei 30 Min./58° restlos inaktiviert. Aus den Untersuchungen von GASTPAR und Ma. (14, 77) geht hervor, dass auch bei 30 Min./58° noch eine gewisse Restaktivität vorhanden ist, welche jedoch praktisch nicht mehr ins Gewicht fallen dürfte.

III. DIE ANTITHROMBINWIRKUNG DES HEPARINS IM SERUM

HOWELL (78) und QUICK (42) stellten fest, dass Heparin auch in Verbindung mit Normalserum einen starken Antithrombineffekt entfaltet. Demgegenüber konnten ASTRUP-DARLING (9) sowie USTERI (39) in ihren Experimenten zeigen, dass der Co-Faktor bei der Gerinnung zerstört wird. Er konnte 10 Minuten nach Eintritt der Gerinnung nicht mehr nachgewiesen werden. Auch hier zeigen sich also starke Divergenzen, welche vielleicht teilweise darauf zurückzuführen sind, dass die verschiedenen Untersucher ihre Versuche mit dem Blut verschiedener Tierarten durchführten. So verwendete HOWELL (78) Katzen- und Hundeblut, QUICK (42) Kaninchenblut, ASTRUP-DARLING (9) Rinderblut, während USTERI (39) mit Menschenblut arbeitete. Auch die differierende Thermolabilität könnte teilweise durch Artspezifität des Co-Faktors erklärt werden. BURSTEIN konnte z.B. zeigen, dass der Co-Faktor des Rinderblutes gegenüber dem Co-Faktor des Menschenblutes thermostabiler ist und erst bei 30 Min/62° zerstört wird.

Der Heparininhibitor .

Eine weitgehende Klärung über die Co-Faktorwirkung im Serum konnten erst GASTPAR und Ma. (13, 14, 77) erbringen. Auch sie fanden zunächst (13) im unverdünnten menschlichen Serum bei der verwendeten Heparinkonzentration keine Co-Faktoraktivität, im Gegenteil, es war sogar eine gewisse Gerinnungsbeschleunigung gegenüber dem Nullwert. nachweisbar. Wurde jedoch das verwendete Serum verdünnt, so resultierte eine typische, biphasische Wirkungskurve, solcherart, dass die Antithrombinwirkung bei gleicher Heparinkonzentration mit steigender Serumverdünnung stetig zunahm, bis zu einem gewissen Maximum, welches für jedes Serum bei einer anderen Konzentration lag, um dann

bei noch weiterer Serumverdünnung wieder abzufallen, bis die Ausgangsaktivität des gereinigten Systems wieder erreicht war.

Dieser Heparineffekt im Serum war anfangs nicht erklärbar. GASTPAR und Ma. (13) suchten dann die Heparinhemmung im verdünnten Serum und die langsame, aber stetige Enthemmung der Heparinwirkung mit fallender Serumkonzentration so zu erklären, dass der Co-Faktor bei der Gerinnung nicht zerstört wird, wie von ASTRUP-DARLING (9) und USTERI (39) angenommen wurde, sondern durch einen Heparininhibitor überdeckt wird. Im Verlauf ihrer weiteren Untersuchungen konnten GASTPAR und Ma. (14, 77) dann mit verschiedenen Heparinkonzentrationen an geometrischen Verdünnungsreihen desselben Serums interessante Heparinwirkungskurven ermitteln: sie fanden, dass mit steigender Heparinkonzentration kein biphasischer Kurvenverlauf mehr resultiert, sondern auch im unverdünnten Serum eine starke Antithrombinaktivität nachweisbar wird, welche annähernd so gross ist wie die im entsprechenden Plasma. Daraus ergibt sich jedoch, dass der Heparininhibitor im Gegensatz zum Co-Faktor in viel geringerer Konzentration vorliegt, dagegen eine grössere Affinität zum Heparin besitzen muss als der Co-Faktor; d.h. wenn die Heparinkonzentration gross genug ist kann auch im Serum die volle Co-Faktoraktivität nachgewiesen werden. Der Co-Faktor und der Inhibitor scheinen sich gegenseitig nicht zu beeinflussen, es kommt jedoch auf Grund ihrer verschiedenen Konzentration und Affinität zu interessanten Wechselwirkungen mit dem Heparin. Der Heparin Co-Faktor-Komplex wird durch den Inhibitor nicht beeinflusst, wie GASTPAR und Ma. (13) anhand von in vivo-Untersuchungen feststellen konnten.

Im Plasma konnte der Heparininhibitor nicht nachgewiesen werden. Er kann also erst bei der Gerinnung entstehen. GASTPAR und Ma. (14, 77) nehmen an, dass es sich um einen Thrombozytenzerfallstoff handelt, nachdem derselbe auch im plättchenfreien defibrierten Plasma nicht nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um den Heparininhibitor von JÜRGENS (79) bzw. dem Thrombozytenfaktor 4 von DEUTSCH-JOHNSON-SEEGERS (80).

Durch Ausschaltung des Co-Faktors mittels Hitzeinaktivierung 30 Min/58° konnten GASTPAR und Ma. (14, 77) eine Aktivitätskurve des Inhibitors

aufstellen. Es zeigte sich, dass derselbe bei dieser Temperatur noch seine volle Aktivität besitzt. Dies steht zwar im Widerspruch zu den Untersuchungen von DEUTSCH-WAWERSICH-FRANKE (81) welche feststellen, dass ihr auf chemischem Wege erhaltener Thrombozytenfaktor IV seine Aktivität bei 30 Min/50° bzw. 20 Min/60° völlig verliert, dürfte jedoch u. E. auf die unterschiedliche Versuchsanordnung zurückzuführen sein.

IV. DISKUSSION

Auf Grund der bisherigen, obig referierten Befunde kann der Wirkungsmechanismus des Heparins als Antithrombin keineswegs als bekannt bezeichnet werden. Es besteht vor allem insofern ein Widerspruch als einmal ein Co-Faktor - und zwar ein Plasmaprotein - für die Heparinwirkung nötig zu sein scheint, zum anderen aber Heparin im gereinigten System allein ebenfalls eine - wenn auch verhältnismässig geringe - Antithrombinwirkung entfaltet.

Das dem Heparin selbst als stark negativ geladener Körper eine grosse Bedeutung bei der Antithrombinwirkung zukommt, ergibt sich schon allein daraus, dass verschiedene synthetische und teilsynthetische Produkte mit Heparinähnlicher, aber auch anderer Struktur in vitro eine dem Heparin vergleichbare Wirkung besitzen, wenn sie auch in vivo fast alle stark toxisch sind (82 - 85). Sie haben alle dem Heparin gemeinsam ein höheres Molekulargewicht und negativ geladene Gruppen. Die Heparinwirkung scheint also weniger an die chemische Struktur als an die spezifisch reagierenden Gruppen, nämlich die $\text{NH-SO}_3\text{H}$ - Gruppen, gebunden zu sein.

Es dürfte nach den bisherigen Untersuchungen sicher sein (12 - 15, 69), dass Heparin auch ohne Co-Protein eine Wirkung auf die Thrombin-Fi-

brinogenreaktion im Sinne einer Reaktionsverzögerung besitzt. Ob es dabei durch Bildung einer Heparin-Thrombin-Komplexverbindung (17 - 19) zu einer elektrischen Potentialverschiebung und damit zu einer Fermenthemmung (28) kommt, oder ob die Thrombinwirkung durch intermolekulare Blockierung der Fibrinpolymerisation gehemmt wird (20, 21) ist noch nicht geklärt. Daneben scheint eine katalytische Wirkung auf die Thrombinadsorption an Fibrinogen-Fibrin zu bestehen (29, 32). Wahrscheinlich handelt es sich aber bei der Heparinwirkung im gereinigten System um einen komplexen Hemmungsvorgang, wobei elektrostatische Momente eine entscheidende Rolle spielen. Heparin dürfte auf Grund seiner starken negativen Ladung zu einer Verschiebung des kolloidchemischen Gleichgewichtes und zu einer Blockierung der Bindung der reagierenden Eiweisskomponenten führen (16, 35), wodurch es einmal zu einer Heparin-Thrombin-Komplexverbindung und damit zu einer Reaktionsverzögerung als auch zu einer Blockierung des dreidimensionalen Polymerisationsproduktes sowie zu einer katalytischen Adsorptionssteigerung und Fixierung des Thrombins an die Fibrinnetzwerkstruktur kommen dürfte (27). Neben diesen mehr dynamischen Effekten, welche wahrscheinlich erst bei höheren Heparinkonzentrationen manifest werden, besteht eine mittelbare Heparinwirkung auf das Thrombin in Verbindung mit einem plasmatischen Co-Faktor. Die Grösse der Thrombininaktivierung scheint von der Konzentration des Co-Faktors, die Reaktionsgeschwindigkeit von der Heparinkonzentration abhängig zu sein (44, 75). In neueren Untersuchungen konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass das Co-Faktor-Protein und Antithrombin III identisch sind (19, 45, 46, 56, 71, 74). Heparin scheint demnach die Affinität des Antithrombin III zu Thrombin und damit die Reaktionsgeschwindigkeit des Thrombinaktivierungsprozesses zu steigern (45, 46, 56, 71). Ausserdem soll Heparin den Antithrombin III-Verbrauch steigern (32, 47, 56, 63). Antithrombin III scheint damit 2 Aktivitäten zu beinhalten, nämlich die Co-Faktor- und die Antithrombin III-Aktivität (19, 74).

Der Heparin-Co-Faktor ist ein Plasmaprotein und zwar ein γ -Globulin (18, 19) bzw. ein γ -Lipoprotein (46, 72, 73), welches bei der Gerinnung nicht zerstört wird (13). Er konnte auch im 24 Stunden alten Normalplasma in voller Aktivität nachgewiesen werden (14, 77). Sein Nachweis gelingt nur in verdünntem Serum, da seine Wirkung in unverdünntem

Serum - ausser bei sehr grossen Heparinkonzentrationen - weitgehend durch einen Heparininhibitor überdeckt wird (13, 14, 77). Es handelt sich dabei um einen Thrombozytenzerfallstoff (79), den Thrombozytenfaktor 4 (80). Die Konzentration des Inhibitors ist bedeutend geringer, seine Affinität zum Heparin dagegen grösser als die des Co-Faktors (13, 14, 77). Der Heparin-Co-Faktor-Komplex wird vom Heparininhibitor nicht angegriffen (13). Während der Co-Faktor durch Hitzeinaktivierung 30 Min/58° fast völlig zerstört wird, scheint der Inhibitor bei dieser Temperatur noch seine volle Wirksamkeit zu besitzen (44, 77).

Die Kinetik der Antithrombinwirkung des Heparins wird - ähnlich wie das gesamte Blutgerinnungssystem - durch aktivierende und hemmende Faktoren gesteuert. Co-Faktor und Inhibitor scheinen sich gegenseitig nicht zu beeinflussen. Auf Grund ihrer verschiedenen Konzentration und Affinität kommt es jedoch zu verschiedenartigen Wechselwirkungen mit dem Heparin, je nachdem der aktivierende Co-Faktor oder der Inhibitor die Valenzen des Heparins besetzt. Über die Bindungsart des Heparins an Co-Faktor und Inhibitor ist noch wenig bekannt. Die Tatsache, dass in vivo der Heparin Co-Faktor-Komplex vom Inhibitor nicht angegriffen wird (13), lässt auf eine irreversible Bindung schliessen.

Ein Grossteil der vielseitigen Hemmwirkungen des Heparins auf Fermente und Proteohormone ist durch seine Bindung an basische Gruppen biologisch aktiver Proteine erklärbar, ebenso wie die vielen durch Heparin ausgelösten Wirkungen auf Blutkreislauf, Blutgefässe, Formelemente und Gerinnung des Blutes in kausalem Zusammenhang mit seiner grossen Affinität zu basischen Verbindungen gebraucht werden können (86).

V. EXPERIMENTELLER TEIL.

Zur Untersuchung der wechselseitigen Beziehungen aktivierender und hemmender Faktoren bei der Heparinwirkung auf die II. Gerinnungsphase musste ein Gerinnungssubstrat gewählt werden, an welchem unter gleichen experimentellen Bedingungen sowohl die im Serum als auch die im Plasma vorhandenen, die Heparinwirkung beeinflussenden, Faktoren getestet werden können. Wir verwendeten wie GASTPAR und Ma. (77) als Gerinnungssubstrat eine Fibrinogenlösung. Von den zu untersuchenden Systemen wurden geometrische Verdünnungen hergestellt. Die Anti-thrombinwirkung des Heparins wurde an Hand der Thrombinzeitbestimmung von JÜRGENS (87) gemessen.

1. Methodik.

Es wurde mit geometrischen Verdünnungsreihen von Humanplasma, thrombocytenfreiem Plasma, defibriertem Plasma und Serum gearbeitet. Die Substrate wurden verschiedenen Bedingungen unterworfen, welche jeweils angegeben sind. Das Volumen der Verdünnungsreihen betrug pro Glas 0,5 ml. Als Gerinnungssubstrat wurde jedem Glas 0,2 ml Fibrinogenlösung (0,6 %iges Fibrinogen "Behring") zugesetzt. Die Heparinkonzentration wurde variiert. Sie betrug 1,0; 0,5; 0,25 IE/ml (Heparin: Biochemicum "Roche"). Zur Testung der Gerinnungszeit wurde jedem Glas schliesslich 0,2 ml Thrombinlösung (= 2 NIH Einheiten Test-thrombin "Behring") zugegeben.

Der Versuchsansatz lautete in der Reihenfolge der Zugabe: 0,5 ml Substratverdünnung + 0,1 ml Heparinverdünnung + 0,2 ml Fibrinogenlösung + 0,2 ml Thrombinlösung. Der Ansatz: Substratverdünnung - Heparin - Fibrinogen wurde bei 37°C 5 min im Wasserbad inkubiert, dann die Fibrinogenlösung eingeblasen und die Gerinnungszeit gestoppt.

Es wurden von jedem Wert 3 Einzelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert daraus berechnet. Der Nullwert am heparinisierten Thrombin-Fibrinogensystem wurde gleich 100 % gesetzt und die bei den einzelnen Substratverdünnungen errechneten Mittelwerte dazu in prozentuale Beziehung gebracht.

Auf eine graphische Darstellung der gefundenen Werte wurde aus technischen Gründen verzichtet. Zur besseren bildlichen Verständlichkeit der Tabellen verweisen wir auf die Arbeiten von GASTPAR und Ma. (14, 77) welche ähnliche Kurvenbilder enthalten.

2. Die Wirkung verschiedener Heparinkonzentrationen auf eine geometrische Serumverdünnung .

24-Stunden altes Normalserum (Aufbewahrung bei 4° C)

Tabelle 1:

Heparin- Konzentr. IE/ml	Gerinnungszeitveränderungen in % gegenüber dem Nullwert (= 100 %) bei geometrischer Substratverdünnung								
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
I. 1,0	>1000	586	256	132	116	108	103	100	100
II. 0,5	152	254	188	142	127	118	108	103	100
III. 0,25	70	87	99	112	120	120	117	110	100

Für die Heparinkonzentration 0,25 IE/ml ergibt sich eine biphasische Wirkungskurve, die hinsichtlich der beiden ersten Verdünnungsstufen noch unter dem heparinisierten Nullwert liegt. Bei Verdoppelung der Heparinkonzentration auf 0,5 IE/ml zeigt sich ein exzessiver Anstieg der Aktivität, welcher bei weiterer Verdoppelung auf 1,0 IE/ml im unverdünnten Serum Werte erreicht, wie sie etwa für Plasma gefunden werden. Es ist also bei einer Heparinkonzentration von 1,0 IE/ml keine Heparinhemmung im unverdünnten Serum mehr nachweisbar. Die überschüssige Heparinmenge

ist hier so gross, dass die Inhibitorwirkung im Kurvenverlauf nicht mehr zum Ausdruck kommt. Aus dem Ergebnis der 3 Verdünnungsreihen ergibt sich, dass im Serum die volle Co-Faktoraktivität vorhanden sein muss. Andererseits kann der Inhibitor im Verhältnis zum Co-Faktor nur in minimaler Konzentration vorhanden sein, und daher auch nur eine sehr begrenzte Menge Heparin neutralisieren. Aus dem biphasischen Verlauf der Kurven II und III kann weiterhin gefolgert werden, dass die Affinität des Inhibitors zum Heparin grösser sein muss als die des Co-Faktors.

3. Die Wirkung von Heparin auf hitzeinaktiviertes Serum.

Um eine Aktivitätskurve für den Heparininhibitor aufzustellen musste ein Substrat gewählt werden, in welchem der Co-Faktor ausgeschaltet ist. Da BURSTEIN (45) sowie GASTPAR und Ma. (14, 77) im Gegensatz zu ASTRUP-DARLING (9) und USTERI (10) zeigen konnten, dass der Co-Faktor erst bei 58°C zerstört wird, verwendeten wir ein 24-Stunden altes Humanserum, welches wir 5, 15, 30 und 40 min bei 58°C inaktivierten.

Tabelle 2 a: Heparinkonzentration 1,0 IE/ml

Substrat:		Gerinnungszeitveränderungen in % gegenüber dem Nullwert (= 100 %) bei geometrischer Substratverdünnung							
		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
I.	18 ⁰	>1000	553	180	126	112	106	103	100
II.	5'58 ⁰	>1000	286	148	113	107	103	100	
III.	15'58 ⁰	288	159	129	107	100			
IV.	30'58 ⁰	110	117	110	100				
V.	40'58 ⁰	100	103	100					

Tabelle 2 b: Heparinkonzentration 0,5 IE/ml

I.	18 ⁰	133	187	163	138	123	107	102	100
II.	5' 58 ⁰	115	127	119	109	103	100		
III.	15' 58 ⁰	100	118	107	103	100			
IV.	30' 58 ⁰	87	98	101	103	100			
V.	40' 58 ⁰	72	86	96	98	100			

Tabelle 2 c: Heparinkonzentration 0,25 IE/ml

I.	18 ⁰	79	97	108	118	116	109	100
II.	5' 58 ⁰	75	88	98	106	103	100	
III.	15' 58 ⁰	62	76	86	94	98	100	
IV.	30' 58 ⁰	53	60	68	82	100		
V.	40' 58 ⁰	48	60	78	93	100		

Aus Tabelle 2 a - c ist ersichtlich, dass der Co-Faktor erst bei 40 min 58⁰ C restlos ausgeschaltet ist. Die interessanteste Verdünnungskurve ergibt sich für 0,25 IE/ml bei 40 min 58⁰ C in Tabelle 2 c, welche die isolierte Aktivität des Heparininhibitors wiedergeben dürfte. Es zeigt sich, dass bereits bei einer Serum-Verdünnung von 1/16 die Konzentration so gering ist, dass keine Heparinhemmung mehr resultiert. Damit dürfte nachgewiesen sein, dass der Co-Faktor tatsächlich in einer beträchtlich höheren Konzentration im Serum vorhanden ist, denn aus Tabelle 1 und 2 a/I geht hervor, dass auch bei einer Serumverdünnung von 1/64 stets noch eine Co-Faktoraktivität nachgewiesen werden kann. Das würde grob gerechnet besagen, dass im Serum der Co-Faktor in einer viermal so grossen Konzentration gegenüber dem Inhibitor vorhanden ist (zumindest in dem von uns hier verwendeten Serum).

4. Die Wirkung der Thrombocyten auf die Heparinaktivität.

WAUGH-RUDDIK (87) konnten schon zeigen, dass die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin umso grösser ist, je kleiner die Anzahl der Thrombocyten im Versuchsansatz ist. Dies konnte später von anderen Autoren bestätigt werden (88 - 96). In ausgedehnten Versuchsreihen fanden GROSS und Ma. (97) bei der mathematischen Auswertung ihres Materials, dass bei steigenden Heparinkonzentrationen die resultierende Gerinnungszeitverlängerung direkt umgekehrt proportional der Thrombocytenzahl ist.

Wir stellten eine Verdünnungsreihe eines Plasmas her, welches in paraffinierten Gefässen abgenommen wurde und durch Zentrifugierung (30 min 5 000 rpm) weitgehend plättchenfrei (4 000 Thrombocyten/mml im Phasenkontrastmikroskop) gemacht wurde und verglichen damit einmal eine Verdünnungsreihe eines thrombocytenhaltigen Plasmas derselben Person, welches ebenfalls in paraffinierten Gefässen abgenommen wurde, das andere mal eine Verdünnungsreihe eines thrombocytenhaltigen Plasma derselben Person, welches in einem Glas mit aufgerauter Oberfläche abgenommen und hinterher mehrmals geschüttelt wurde. Die Heparinkonzentration betrug jeweils wieder 1,0; 0,5 und 0,25 IE/ml.

Tabelle 3 a: Thrombocytenfreies Plasma

Heparin-Konzentr. IE/ml	Gerinnungszeitverlängerung in % gegenüber dem Nullwert (= 100 %) bei geometrischer Substratverdünnung							
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
I. 1,0	>1000	>1000	338	176	142	120	109	100
II. 0,5	>1000	>1000	212	150	128	114	106	100
III. 0,25	>1000	221	172	136	120	112	104	100

Tabelle 3 b: Thrombocytenhaltiges Plasma (Abnahme paraffiniertes Gefäß)

I.	1,0	>1000	546	212	147	123	112	105	100
II.	0,5	887	293	167	131	118	109	103	100
III.	0,25	338	201	142	123	112	105	102	100

Tabelle 3 c: Thrombocytenhaltiges Plasma (Abnahme Gefäß mit Oberflächenwirkung)

I.	1,0	>1000	256	169	121	110	103	100	
II.	0,5	291	264	145	125	112	106	102	100
III.	0,25	182	198	139	120	109	102	100	

Die Thrombocyten bewirken also eine deutliche Heparinhemmung in unserer Versuchsreihe, welche besonders bei den hohen Plasmakonzentrationen manifest wird. Bei dem von uns verwendeten thrombocytenhaltigen Plasma in Tab. 3 b handelt es sich - wie schon bemerkt - um ein Plasma, welches in paraffinierten Gefäßen abgenommen und sorgsamst vor Alterationen bewahrt wurde, sodass die Thrombocyten sich noch in funktionstüchtigem Zustand befanden, was wir auch im Phasenkontrast nachweisen konnten. Es können also keine nennenswerten Mengen Thrombocytenzerfallsstoffe vor Verwendung freigesetzt worden sein. Trotzdem ergibt sich bereits eine starke Differenz in der Heparinaktivität mit dem thrombocytenfreien Plasma in Tab. 3 a. In Tab. 3 c zeigt sich mit dem Plasma, welches in Gefäßen mit aufgerauter Oberfläche abgenommen und alteriert wurde, ein weiterer starker Aktivitätsabfall, welcher hauptsächlich in den ersten 3 Gläsern auffällig ist. In Tab. 3 c/III bei einer Heparinkonzentration von 0,25 IE/ml resultiert bereits die Andeutung der charakteristischen biphasischen Wirkungskurve, wie wir sie in ausgeprägter Form beim Serum finden. Der von uns nachgewiesene Heparinhemmende Faktor stammt somit sicher aus den Thrombocyten.

CREVELD-PAULSSEN (98) konnten erstmals aus den Thrombocyten einen Faktor isolieren, welcher einen deutlichen Antiheparineffekt aufwies. JÜRGENS (79) und DEUTSCH-JOHNSON-SEEGERS (80) gelang es mittels der Ultrazentrifuge diesen Faktor als wasserlösliche Fraktion darzustellen.

Er wurde von Ihnen als Thrombocytenfaktor 4 bezeichnet. BURSTEIN-GUINAND (99) kamen zu ähnlichen Resultaten. GASTPAR und Ma. (14, 77) konnten dann zeigen, dass die in den Serumverdünnungsreihen auftretende Heparinhemmung durch diesen Thrombocytenfaktor 4 bedingt ist.

Als Substrat für den Co-Faktor verwendeten wir ein difibriniertes, thrombocytenfreies Plasma (Hitzedefibrinierung 10/min 56°C). Zum Vergleich diente ein defibriniertes, thrombocytenhaltiges Plasma, sowie ein aus spontan geronnenem Nativblut erhaltenes Serum derselben Person. Die Heparinkonzentration betrug 0,25 IE/ml.

Tabelle 4: I. Thrombocytenfreies, defibriniertes Plasma
II. Thrombocytenhaltiges, defibriniertes Plasma
III. Serum

Substrat Gerinnungszeitveränderungen in % gegenüber dem Nullwert (= 100 %) bei geometrischer Substratverdünnung.

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
I.	>1000	333	170	135	118	109	103	100
II.	620	225	157	128	116	108	103	100
III.	68	88	100	114	126	120	112	100

Während mit thrombocytenfreiem, defibriniertem Plasma (I) und thrombocytenhaltigem, defibriniertem Plasma (II) eine starke Heparinaktivierung resultiert, ergibt sich im normal geronnenem Serum (III) derselben Versuchsperson die bereits vorher beschriebene Heparinhemmung. Es zeigt sich, dass die Heparinhemmung nur im Serum nachweisbar und somit an die Zerstörung von Thrombocyten gebunden ist. Durch die Hitze-defibrinierung werden die Thrombocyten nicht geschädigt wie aus dem Vergleich der Kurven I und II mit den Tabellen 3 a und 3 b hervorgeht. Nach den Untersuchungen von ASTRUP-DARLING (9) und USTERI (39) ist erst 15 min nach Beendigung der Gerinnung die Heparinaktivierung völlig gehemmt. Der bei der Gerinnung freigesetzte Heparininhibitor besitzt also erst zu diesem Zeitpunkt seine volle Aktivität.

5. Der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität des Co-Faktors und Inhibitors.

Im folgenden verwendeten wir dasselbe thrombocytenfreie, defibrinierte Plasma und Serum wie in Tabelle 4. Beide Substrate wurden bei 30 min/58° C hitzeinaktiviert. Die Heparinkonzentration betrug wieder 0,25 IE/ml.

Tabelle 5: I. Thrombocytenfreies, defibriniertes Plasma 30min/58°
 II. Serum 30 min/58°

Substrat Gerinnungszeitveränderung gegenüber dem Nullwert
 (= 100 %) bei geometrischer Substratverdünnung.

	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
I.	118	109	100		
II.	54	62	73	89	100

In beiden Kurven zeigt sich der bekannte Effekt, dass der Co-Faktor durch Hitzeinaktivierung 30 min/58° C fast völlig zerstört wird. Der Inhibitor ist im Gegensatz dazu bei dieser Temperatur thermostabil. Dies steht zwar im Widerspruch zu den Untersuchungen von DEUTSCH-WAWERSICH-FRANKE (81), welche feststellen, dass ihr auf chemischem Wege gewonnener Thrombocytenfaktor 4 seine Aktivität bei 30 min/50° C bzw. 20 min 60° C völlig verliert. Möglicherweise beruht dieser Widerspruch auf der unterschiedlichen Versuchsanordnung. Als nächstes wurde der Einfluss der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen auf die Aktivität des Co-Faktors und des Inhibitors untersucht. Ein Normalserum wurde nach Abnahme in drei Portionen geteilt und je eine Portion 24 Stunden bei 4°, 18° und 37° unter Luftabschluss inkubiert. Anschliessend wurde von jeder wieder eine geometrische Verdünnungsreihe angefertigt. Die Heparinkonzentration betrug 0,5 IE/ml.

Tabelle 6.

Substrat:	Gerinnungszeitverlängerung in % gegenüber dem Nullwert							
Serum	(= 100 %) bei geometrischer Substratverdünnung.							
24 Stunden	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
I. 4°C	150	178	156	130	114	106	102	100
II. 18°C	179	186	164	132	116	105	101	100
III. 37°C	266	232	176	141	117	107	103	100

Aus Tab. 6 ist ersichtlich, dass der Inhibitor bei Lagerung 24 Stunden bei Zimmertemperatur und in noch stärkerem Masse bei 37°C seine Aktivität weitgehend verliert. Der biphasische Verlauf der Kurve I verschwindet. Er ist Kurve II nur noch angedeutet und in Kurve III überhaupt nicht mehr vorhanden. Es wäre jedoch auch denkbar, dass durch die Inkubierung bei 37°C über 24 Stunden die Co-Faktoraktivität gesteigert wird.

6. Aktivitätskurven des Heparin-Co-Faktors (Antithrombin II) und des Heparininhibitors (Thrombocytenfaktor 4).

Da der Co-Faktor im Serum bei einer Temperatur völlig ausgeschaltet werden kann (40 min/58°C), bei welcher der Inhibitor noch seine volle Aktivität besitzt, ist es auf relativ einfache Weise möglich, eine Aktivitätskurve des Inhibitors aufzustellen. Durch Entfernen der Thrombocyten aus einem Plasma ist es auf der anderen Seite leicht möglich, genaue Aktivitätskurven für den isolierten Co-Faktor zu erhalten.

Im folgenden verwendeten wir 24 Stunden alte Seren von 5 gesunden Personen, welche annähernd die gleiche Thrombocytenzahl aufwiesen. Die Seren wurden 40 min/58°C hitzeinaktiviert. Sodann wurden Verdünnungsreihen aufgestellt, und die Inhibitoraktivität bei 100, 70, 50, 30 und 10 % Verdünnung bestimmt.

Heparinkonzentration 0,25 IE/ml. Ergebnis siehe Tab. 7. Es wurden wieder je drei Einzelbestimmungen durchgeführt. Die Mittelwertskurve ist in Abb. 1 mit Angabe der Streuung graphisch dargestellt. (Schraffierte Fläche).

Tabelle 7:

Substrat Gerinnungszeitverkürzung gegenüber dem Nullwert
Serum (= 100 %) bei angegebener Substratverdünnung.

40 min/58° 100% 70% 50% 30% 10%

I.	67	69	72	77	87
II.	73	73	75	77	80
III.	61	65	70	80	87
IV.	58	62	66	76	88
V.	53	58	62	68	93

M. W. 62 65 69 76 87

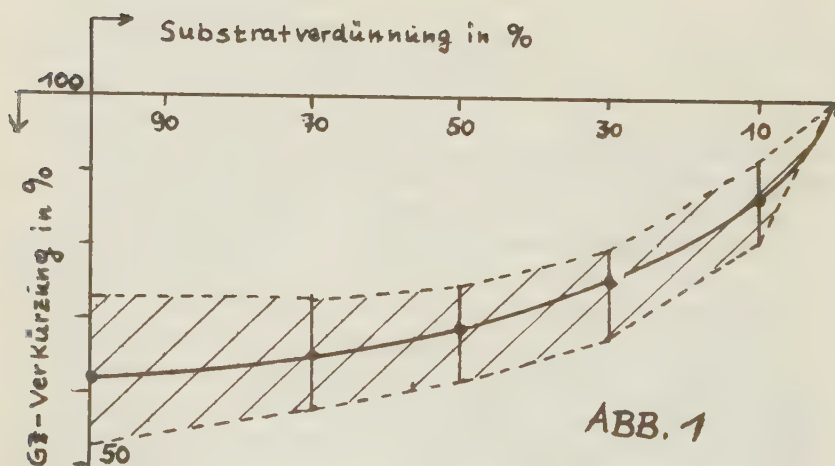


ABB. 1

Wie aus Tab. 7 bzw. Abb. 1 hervorgeht, ergibt sich eine leicht nach oben geneigte Aktivitätskurve des Inhibitors. Die Aktivitätsbestimmungen an den zu untersuchenden Seren müssten am besten mit 25 %igem Serum durchgeführt werden, da in diesem Bereich die Aktivitätseichkurve wegen ihrer stärkeren Neigung die genaueste Bestimmung zulässt. Ausserdem hält sich die Fehlerbreite in diesem Bereich in erträglichen Grenzen. Nach informativen Untersuchungen, welche GASTPAR und Ma. durchführten scheint die Aktivität des Inhibitors bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedlich zu sein, was nicht allein durchdifferierende Thrombocytenzahlen und die unterschiedliche Schwankungsbreite der Methode erklärt werden kann. Eine Bestimmung des Heparininhibitors m mit dieser Methode auf gerinnungsphysiologischem Wege scheint von klinisch klinischem Interesse zu sein. Unterschiedliche Aktivitäten des Plättchenfaktors 4 geben Einblick in die Funktionstüchtigkeit der Thrombocyten und man hat auf diese Weise ausser der Bestimmungsmethode des Thrombocytenfaktors 3 mittels des Thromboplastin-Generationstestes von BIGGS eine weitere Methode, um Thrombocytenfunktionsstörungen näher zu untersuchen.

Im folgenden wurden von 5 thrombocytenfreien Plasmen Versünnungsreihen aufgestellt und die isolierte Co-Faktoraktivität bei 100, 80, 50, 30 und 10 % Verdünnung bestimmt. Heparinkonzentration 0,25 IE/ml. Ergebnis Tabelle 8.

Tabelle 8:

Substrat: Gerinnungszeitverlängerung gegenüber dem Nullwert
Plasma (= 100 %) bei Verdünnung:

Thromb. fr.	100	80	50	30	10
I.	> 1000	599	282	194	138
II.	> 1000	560	264	177	122
III.	982	528	233	183	134
IV.	> 1000	531	218	169	125
V.	> 1000	602	298	207	131
MW.	1000	564	257	186	130

Die Aktivitätskurve für den Co-Faktor am Thrombocytenfreien Plasma ist so steil, dass eine graphische Darstellung kaum möglich ist, weswegen wir hier darauf verzichten. Dies zeigt, dass die Heparinkonzentration von 0,25 IE/ml für diesen Zweck zu gross ist. Man muss die Heparinkonzentration auf 0,1 IE/ml verringern um brauchbare Werte zu erhalten. Wir glauben auch, dass die Heparinkonzentration von 0,25 IE/ml bei der Aufstellung der Aktivitätskurve für den Inhibitor noch zu gross ist. Sicher kann man auch hier mit der Konzentration noch auf 0,1 IE/ml heruntergehen. GASTPAR und Ma. sind zur Zeit mit der Aufstellung entsprechender Aktivitätseichkurven beschäftigt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Nach gründlicher Darlegung und Diskussion der bisherigen Arbeiten über die Wirkung des Heparins als Antithrombin, werden die Ergebnisse eigener experimenteller Untersuchungen über Eigenschaften und Wirkungsweise des Heparin-Co-Faktors und Heparin-Inhibitors vorgelegt. Die dabei von uns angewandte Versuchsanordnung wurde von GASTPAR inauguriert.

2. Der Co-Faktor ist ein Plasmaprotein, welches bei der Gerinnung nicht zerstört wird. Er besitzt im Serum seine volle Aktivität. Es wird durch Hitzeinaktivierung 40 min/58⁰C vollständig zerstört. Seine Konzentration im Serum ist verhältnismässig gross; bei einer Verdünnung von 1 : 64 ist stets noch eine messbare Restaktivität vorhanden.

3. Der Heparin-Inhibitor ist im Gegensatz dazu bei 40 min/58⁰C thermostabil, seine Konzentration im Serum ist beträchtlich geringer und beträgt gegenüber dem Co-Faktor ca 25 %. Seine Affinität zum Heparin ist dagegen grösser als die des Co-Faktors. Der Inhibitor ist im thrombocytenfreien defibrinierten Plasma nicht vorhanden. Es handelt sich dabei um einen Thrombocytenzerfallsstoff, den Thrombocytenfaktor 4. Durch Lagerung 24 Stunden bei Zimmertemperatur und in noch stärkerem Masse bei 37⁰C verliert der Inhibitor weitgehend seine Aktivität, während Lagerung 24 Stunden bei 4⁰C keinen Aktivitätsabfall bewirkt.

4. Auf Grund unserer Versuchsanordnung wird eine Aktivitätskurve für den Inhibitor aufgestellt. Es ist somit auf gerinnungsphysiologische Weise möglich, die Aktivität des Thrombocytenfaktors 4 zu ermitteln.

VII. LITERATURVERZEICHNIS.

1. Mc Lean, J.: Amer.J.Physiol. 41, 250 (1916)
2. Howell, W.H. u. E. Holt:
Amer.J.Physiol. 47, 328, (1918)
3. Quick, A.: Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 35, 391, (1936)
4. Fischer, A.: Enzymologia 1, 81, (1936)
5. Brinkhous, K.M., H.P. Smith, E.D. Warner u. W.H. Seegers:
Amer.J.Physiol. 125, 683, (1939)
6. Ferguson, I.H.: Amer.J.Physiol. 130, 759 (1940)
7. Jaques, L.B. u. R.A. Mustard:
Biochem.J. 34, 153, (1940)
8. Chargaff, E., M. Ziff u. D.M. Moore:
J.Biol.Chem. 139, 383, (1941)
9. Astrup, T. u. S. Darling:
Acta Physiol.Scand. 5, 13, (1943)
10. Dyckerhoff, H. u. R. Marx:
Biochem.Z. 316, 255, (1940)
11. Mellanby, J.: Proc.Roy.Soc. London, Ser. B 116, 1, (1934)
12. Shinowara, G.Y.: Amer.J.Physiol. 156, 458, (1949)
13. Gossens, N., H. Gastpar u. W. Seitz:
Klin.Wschr. 1954, 646
14. Gastpar, H., A. Walcher, N. Goosens u. W. Seitz:
Z. Exp. Med. (im Druck)
15. Amann, R. u. E. Werle:
Klin.Wschr. 1957, 22

16. Fischer, A.: Biochem.Z. 278, 133, (1935)
17. Snellman, O., R. Jensen u. B. Sylvén:
Biochim.Biophys. Acta 7, 98, (1951)
18. Lyttleton, J.W.: Biochem.J. 58, 8, (1954)
19. Lyttleton, J.W.: Biochem.J. 58, 15, (1954)
20. Green, J.: Biochem.J. 56, XXI, (1954)
21. Sheppard, E., J. Imperante u. I.S. Wright:
J.Physiol.Chem. 60, 584, (1956)
22. Lorand, L. u. Ma.: Biochem.J. 52, 196, 200, (1952)
23. Laki, K. u. R. Steiner:
J.Polymer.Sci. 8, 457, (1952)
24. Mihályi, E.: Acta Chem. Scand. 4, 344, (1950)
25. Ferry, J.D.: Physiol.Rév. 34, 753, (1954)
26. Morrison, P.R. u. A. Seiler:
Amer.J.Physiol. 168, 421, (1952)
27. Gastpar, H.: Unveröffentlichte, persönliche Mitteilung
28. Jorpes, E.: Heparin in the treatment of thrombosis,
London 1946
29. Klein, P.D. u. W.H. Seegers:
Blood 5, 742, (1950)
30. Wilson, J.S.: Arch.Int.Med. 69, 647, (1942)
31. Seegers, W.H.; M. Niefert u. E.C. Loomis:
Science 101, 520, (1945)
32. Sokal, G.: Acta Haematol. 14, 34, (1955)
33. Marbet, R. u. A. Winterstein:
Experientia 10, 273 (1954)
34. Seegers, W.H., J.F. Johnson u. C. Fell:
Amer.J.Physiol. 176, 97, (1954)

35. Fischer, A. u. Ma.: Biochem.Z. 259, 53, (1933)
36. Sherry, S., W. Troll u. H. Glueck:
Physiol. Rév. 34, 736, (1954)
37. Horanyi, M.: Orvosi Lapja 3, 901, (1947)
38. Usteri, C.: Diss. Zürich 1949
39. Astrup, T. u. S. Darling:
Acta Physiol.Scand. 5, 1, (1943)
40. Volkert, M.: Acta Physiol.Scand. 5, Suppl. 15, (1943)
41. Seegers, W.H., K.D. Miller, E.B. Andrews u. R.C. Murphy:
Amer.J.Physiol. 169, 700, (1952)
42. Quick, A.: Amer.J.Physiol. 123, 712, (1938)
43. Seegers, W.H. u. H.P. Smith:
Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 52, 159, (1942)
44. Seegers, W.H., E.D. Warner, K.M. Brinkhous u. H.P. Smith:
Science 96, 300, (1942)
45. Burstein, M.: Arch.Int.Pharmacodyn. 101, 285, (1955)
46. Loeb, J.: Arch.Sci.Physiol. 10, 129, (1956)
47. Burstein, M. u. A. Guinand:
Arch.Int.Pharmacodyn. 104, 435, (1956)
48. Sheppard, E. u. I.S. Wright:
Arch.Biochem.Biophys. 52, 426, (1954)
49. Bordet, J.: C.R.Soc.Biol. 100, 753, (1929)
50. Gerendás, M.: Acta Physiol.Hung. 1, 7, (1948)
51. Grüning, W.: Pflügers Arch.Physiol. 247, 292, (1944) -
Naturwiss. 1943, 299
52. Wöhlisch, E.: Biochem. Z. 316, 295, (1944)
53. Fell, C., N. Ivanovic, S.A. Johnson u. W.H. Seegers:
Proc.Soc.Exp.Biol. Med.: 85, 199, (1954)

54. Lyons, R.N. : Nature 169, 453, (1952) - Austral.J.Exp.Biol. 32, 113, (1954)
55. Astrup, T. u. S. Darling:
Acta Physiol.Scand. 4, 293, (1942)
56. Waugh, D.F. u. M.A. Fitzgerald:
Amer.J.Physiol. 184, 627, (1956)
57. Burstein, M. u. J. Loeb:
C.R.Acad.Sci. 239, 904, (1954)
58. Seegers, W.H. u. K.D. Miller:
J.Lab.Clin.Med. 38, 950, (1951)
59. Owen, C.A. u. B.F. Mackenzie:
J.appl.Physiol. 6, 696, (1954)
60. Astrup, T. : Acta Scand.Physiol. 7, Supp. 21, (1944)
61. Quick, A. u. J. Favre-Gilly:
Amer.J.Physiol. 158, 387, (1949)
62. Seegers, W.H. : Adv. Encymol. 16, 23, (1955)
63. Mihályi, E. : J.Gen.Physiol. 37, 139, (1953)
64. Owen, C.A. u. J.L. Bollmann:
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 67, 367, (1948)
65. Apitz, K. : Erg. Inn.Med. 61, 54, (1942)
66. Quick, A. : Amer.J.Physiol. 115, 317, (1936)
67. Horn, Z., M. Gerendás u. L. Borsodi:
Experientia 4, 402, (1948)
68. Advardy, M. : Acta Physiol.Scand. 18, 361, (1949)
69. Gorter, E. u. L. Nanninga:
Proc.Konink.Ned.Acad.Wettenschap. 55, 341
(1952) Ser.C.
70. Loomis, E.C. : Amer.J.Lab.Clin.Med. 34, 631, (1949)

71. Burstein, M. u. J. Loeb:
C.R. Acad. Sci. 239, 904, (1954)
72. Chargaff, M. Ziff, D. Moore:
J. Biol. Chem. 139, 383, (1941)
73. Schulze, H. E. u. Ma.: Hoppe Seylers Ztschr. Physiol. Chem. 289, 26,
(1951) Behringwerk-Mittlg. Heft 33, 1957
74. Monkhouse, F. C., E. S. France u. W. H. Seegers:
Circulation 3, 397, (1955)
75. Fitzgerald, M. A. u. D. F. Waugh:
Arch. Biochem. Biophys. 58, 431, (1955)
76. Cohn, E. u. Ma.: J. Amer. Chem. Soc. 72, 465, (1950)
77. Gastpar, H., A. Walcher u. N. Goossens:
VI. Europ. Kongr. Haematol. Kopenhagen 1957.
78. Howell, W. H.: Amer. J. Physiol. 71, 553, (1925)
79. Jürgens, R.: Arch. Exp. Path. Pharmacol. 222, 107, (1954)
80. Deutsch, E., S. A. Johnson u. W. H. Seegers:
Circulation 3, 110, (1955)
81. Deutsch, E., E. Wawersich u. G. Franke:
Thromb. Diath. Haem. 1, 397, (1957)
82. Studer, A., E. Engelberg u. L. O. Randall:
Thrombose und Embolie, S. 883
B. Schwabe & Co Basel 1955
83. Studer, A. u. G. Zbinden:
Schweiz. Z. all. Path. 17, 780, (1954)
84. Hardegg, W., H. Hartert u. G. Hieronymi:
Klin. Wschr. 1957, 788
85. Goossens, N., H. Gastpar u. W. Seitz:
Klin. Wschr. 1958, 524
86. Schultze, H. E.: Scand. J. Clin. Labor. Invest. 10, Suppl. 31,
135 (1957)

87. Jürgens, J.: Dtsch. Arch. Klin. Med. 200, 67, (1952)
88. Waugh, T.R. u. D.V. Ruddick:
Canad. Med. Ass. J. 50, 547, (1944)
89. Conley, C.L. u. Ma.:
J. Clin. Invest. 28, 340, (1949)
90. Conley, C.L. u. Ma.:
J. Clin. Invest. 39, 470, (1950)
91. Soulier, J.P. u. A.J. Le Bolloch:
Rev. Hématol. 5, 148, (1950)
92. Creveld, S.v. u. Ma.:
Acta Haematol. 12, 228, (1954)
93. Creveld, S.v. u. Ma.:
Lancet II, 1951, 242
94. Zollikofer, H.: Zit. bei R. Bally: Z. Klin. Med. 148, 295,
(1951)
95. Cazal, P. u. P. Izarn:
Acta Haematol. 10, 37, (1953)
96. Winterstein, A.: Haemorrhagische Diathesen, Springer, Wien
1955, S. 159
97. Gross, R., J. Heuer u. K. Solth:
Acta Haematol. 16, 147, (1956)
98. Creveld, S.v. u. Ma.:
Lancet, I, 1952, 23 - Schweiz. Med. Wschr.
1955, 399
99. Burstein, M. u. A. Guinand:
Arch. Int. Pharmacodyn. 111, 155, (1957)

Ich danke Herrn Professor Dr. W. SEITZ für die Überlassung des Themas. Herrn Dr. H. GASTPAR spreche ich meinen besonderen Dank aus für seine grosse Hilfe bei den Versuchen sowie für die stete und freundliche Unterstützung beim Literaturstudium und bei der Zusammenstellung der Dissertation.

LEBENS LAUF

Ich bin am 9. August 1923 in Chorosno-Lemberg geboren. Die Volksschule besuchte ich in Chorosno und Schtschüretz, das Gymnasium in Lemberg, und ich legte die Reifeprüfung im November 1942 ab. Vom Jahre 1942 bis 1944 studierte ich Medizin in Lemberg. Ende des Jahres flüchtete ich nach Deutschland und setzte mein Studium weiter fort, sattelte aber zur Zahnmedizin um. Ende 1949 machte ich das Zahnärztliche Staatsexamen und wanderte nach Amerika aus. Im Jahre 1955 kehrte ich nach München zurück, um mein Medizinstudium zu beenden. Am 13. September 1958 machte ich das Ärztliche Staatsexamen.

